

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
11. Jg. 1973, S. 3—14

## Die Analytik der Katecholamine und einiger Abbauprodukte im Urin und Plasma<sup>1)</sup>

Von H. WISSER und E. KNOLL

*Aus der Klinisch-Chemischen Abteilung des Robert-Bosch-Krankenhauses, Stuttgart und der Klinisch-Chemischen Abteilung des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, München*

(Eingegangen am 6. September 1972)

*Herrn Professor Dr. J. Aschoff zum 60. Geburtstag gewidmet*

Die verschiedenen Methoden der Dopamin-, Adrenalin-, Noradrenalin-, Metanephrin-, Normetanephrin-, 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure- und 3-Methoxy-4-hydroxyphenyllessigsäure-Bestimmung werden besprochen. Die klinisch-chemische Bedeutung der Bestimmung ihrer Ausscheidung im Urin wird diskutiert.

### *The analysis of catecholamines and some of their degradation products in urine and plasma*

The different methods for the determination of dopamine, adrenaline, noradrenaline, metanephrine, normetanephrine, 3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid, and 3-methoxy-4-hydroxy-phenylacetic acid are discussed. The clinical-chemical significance of the determination of their urinary excretion is discussed.

Die Erkenntnisse über Biosynthese und Abbau der Katecholamine haben seit der Entdeckung der Dopadecarboxylase (1) und der weiteren Fermente in der Syntheseriehe der Katecholamine, dem Nachweis der einzelnen Zwischenstufen und grundlegenden Untersuchungen über ihren Abbau (2; 3; 4; 5; 6) erheblich zugenommen.

Das in Abbildung 1 wiedergegebene Schema zeigt die bis jetzt bekannten und wichtigsten Schritte der Synthese und des Abbaus. Die Aufgaben der Katecholamine im Organismus sind recht unterschiedlich. Sie haben Beziehungen zum Kreislauf, Glucose- und Fettstoffwechsel, dienen als Neurotransmitter oder Moderatoren im zentralen und peripheren Nervensystem (7) und sind möglicherweise von Bedeutung bei psychiatrischen Erkrankungen (8; 9). Eine annähernd vollständige Beschreibung ihrer mannigfaltigen Funktionen ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Unter der Bezeichnung Katecholamine (oder Katechamine) werden die Verbindungen Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin zusammengefaßt (10). Sie werden im Gehirn, den chromaffinen Zellen, den sympathischen Zellen, den sympathischen Nervenendigungen und möglicherweise auch in den sympathischen Ganglien synthetisiert (11). Die Synthese läuft über mehrere Stufen. Aus Phenylalanin entsteht durch Hydroxylierung in Stellung 4 das Tyrosin (Phenylalaninoxidase, EC 1.14.3.1) aus diesem durch Hydroxylierung in Stellung 3 (Tyrosinhydroxylase EC 1.14...) das 3,4-Dihydroxyphenylalanin, durch Decarboxylierung (Dopa-Decarboxylase EC 4.1.1.26) das Dopamin, durch Hydroxylierung in der  $\beta$ -Stellung der Seitenkette (Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase EC 1.14.2.1) das Noradrenalin und an-

schließend durch Methylierung der primären Aminogruppe (Phenyläthanolamin-N-Methyl-Transferase EC 2.1.1.1...) das Adrenalin.

Die chemische Inaktivierung der Katecholamine kann auf zweierlei Weise erfolgen, und zwar einmal in der Reihenfolge oxidative Desaminierung und anschließende Methylierung in Stellung 3 des aromatischen Ringes, oder in umgekehrter Reihenfolge. Die Endabbauprodukte sind für beide Abbauege gleich. Beim Dopamin sind es die Homovanillinsäure und das 3-Methoxy-4-hydroxy-phenyläthanol und beim Noradrenalin und Adrenalin die Vanillinmandelsäure und das 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylglykol. Erfolgt zuerst die oxidative Desaminierung, kommt es zur Bildung folgender Zwischenpunkte: 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure und 3,4-Dihydroxyphenyläthanol bzw. 3,4-Dihydroxymandelsäure und 3,4-Dihydroxyphenylglykol. Kommt es zuerst zur Methylierung in Stellung 3, so entstehen als Zwischenprodukte das 3-Methoxytyramin, Normetanephrin und Metanephrin.

Die Ausscheidung dieser Verbindungen im Urin ist schon lange bekannt (12). Sie werden in freier und konjugierter Form (als Sulfatester oder Glucuronide) im Harn ausgeschieden. Der konjugierte Anteil an der Gesamtausscheidung beträgt beim Adrenalin und Noradrenalin etwa 50%, bei den Metanephrinen 80% und liegt bei den Phenolcarbonsäuren unter 10% (13; 14; 15). Es konnte gezeigt werden, daß bei Infusion von Adrenalin und Noradrenalin nur etwa 1—4% in unveränderter Form ausgeschieden werden (16) und 30—40% als 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure (17).

<sup>1)</sup> Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen eines Referates von W., H. während des 18. Symposiums der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie in Hannover, 1.—4. März 1972 vorgetragen.

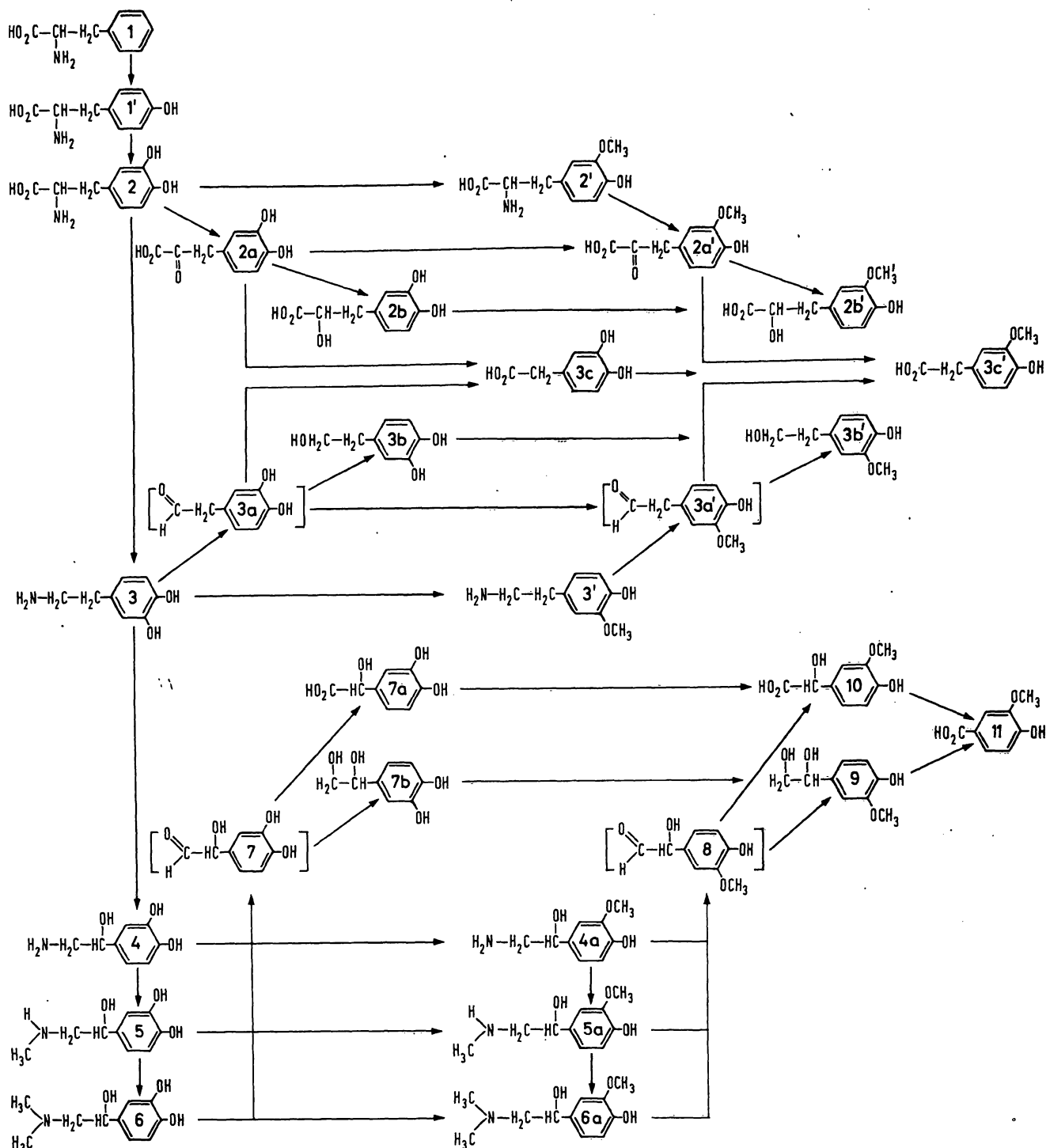


Abb. 1

Biosynthese und Abbau der Katecholamine in Anlehnung an GJESSING (115). Nomenklatur der in diesem Formelschema angegebenen Verbindungen siehe unten.

| Index | Systematische Bezeichnung                   | Trivialname            | Index | Systematische Bezeichnung                             | Trivialname         |
|-------|---|------------------------|-------|---|---------------------|
| 1     | Phenylalanin                                | —                      | 4     | 1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-amino-äthanol               | Noradrenalin        |
| 1'    | 4-Hydroxyphenylalanin                       | Tyrosin                | 4a    | 1-(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)-2-amino-äthanol         | Normetanephrin      |
| 2     | 3,4-Dihydroxyphenylalanin                   | Dopa                   | 5     | 1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-methylamino-äthanol         | Adrenalin           |
| 2'    | 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylalanin            | 3-Methoxytyrosin       | 5a    | 1-(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)-2-methylaminoäthanol    | Metanephrin         |
| 2a    | 3,4-Dihydroxyphenylbrenztraubensäure        | —                      | 6     | 1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-dimethylamino-äthanol       | N-Methyladrenalin   |
| 2a'   | 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylbrenztraubensäure | —                      | 6a    | 1-(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)-2-dimethylamino-äthanol | N-Methylmetanephrin |
| 2b    | 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure               | —                      | 7     | 3,4-Dihydroxyphenylglykolaldehyd                      | —                   |
| 2b'   | 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylmilchsäure        | —                      | 7a    | 3,4-Dihydroxymandelsäure                              | —                   |
| 3     | 3,4-Dihydroxyphenyläthylamin                | Dopamin                | 7b    | 3,4-Dihydroxyphenylglykol                             | —                   |
| 3'    | 3-Methoxy-4-hydroxy-phenyläthylamin         | 3-Methoxytyramin       | 8     | 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylglykolaldehyd               | —                   |
| 3a    | 3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd              | —                      | 9     | 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylglykol                      | —                   |
| 3a'   | 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylacetaldehyd       | —                      | 10    | 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure                        | Vanillinmandelsäure |
| 3b    | 3,4-Dihydroxyphenyläthanol                  | —                      | 11    | 3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure                        | Vanillinsäure       |
| 3b'   | 3-Methoxy-4-hydroxy-phenyläthanol           | —                      |       |   |                     |
| 3c    | 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure              | Homoprotocatechussäure |       |   |                     |
| 3c'   | 3-Methoxy-4-hydroxy-phenyllessigsäure       | Homovanillinsäure      |       |   |                     |

Die genannten Verbindungen sind unterschiedlicher Herkunft. Das im Urin ausgeschiedene Adrenalin entstammt in erster Linie dem Nebennierenmark, das Noradrenalin den sympathischen Nervenendigungen (18). Zu der im Harn ausgeschiedenen 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure tragen mindestens 5 — wahrscheinlich noch mehr — Poole bei. Das ist einmal der Pool des innerhalb der Nerven abgebauten Noradrenalins und der des bei Nervenreizung in den Kreislauf abgegebenen und metabolisierten Noradrenalins. Weiterhin trägt das an den Nervenendigungen freigesetzte und lokal abgebaute, sowie das im Zentralnervensystem metabolisierte Noradrenalin zu der 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure bei, die im Urin ausgeschieden wird. Ein weiterer Anteil stammt von dem Adrenalin des Nebennierenmarks, das in der Leber und anderen Organen abgebaut wird (11). Die Vanillinmandelsäure ist in erster Linie jedoch das Hauptabbauprodukt des in der Peripherie gebildeten Adrenalins und Noradrenalins. Nach Versuchen an Hunden entstammen nur 0,7—1% dem Noradrenalin-Pool des Zentralnervensystems (19). Die Bluthirnschranke ist für das Noradrenalin selbst nicht durchgängig. Der zentrale Anteil des im Harn ausgeschiedenen 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglykols — eines weiteren Abbauproduktes des Noradrenalins — beträgt dagegen 22—27% (19). Schwieriger ist die Beantwortung der Frage nach der Herkunft des Dopamins im Urin. Eine sehr hohe L-Dopadecarboxylaseaktivität (EC 4.1.1.26) besitzen die Nieren (1). Nach intravenöser Injektion von L-Dopa wurden fast 40% als Dopamin im Harn gefunden (20). Somit ist es möglich, daß ein Teil des in der Niere gebildeten Dopamins ohne Rückresorption direkt in den Harn sezerniert wird (7; 21). Weitere Anteile des im Urin ausgeschiedenen Dopamins dürften visceralen (22) und nervalen Ursprungs sein. Der größte Anteil der im Urin ausgeschiedenen 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylethylsäure stammt von dem in der Peripherie abgebauten Dopamin.

Je nach der zu bestimmenden Verbindung und dem zu untersuchenden Material sind die Anforderungen an die Empfindlichkeit der Bestimmungsverfahren sehr unterschiedlich, wie die nächste Tabelle zeigt.

In dieser Tabelle sind die mittleren Konzentrationen der genannten Verbindungen im Plasma und Urin von Normalpersonen gegenübergestellt. Die Werte für den

Urin sind in  $\mu\text{g}/24\text{ h}$  und  $\text{nmol}/24\text{ h}$  angegeben und entsprechen  $\mu\text{g}/\text{l}$  bzw.  $\text{nmol}/\text{l}$ , wenn man der Einfachheit halber eine mittlere Harnausscheidung von 1 l pro 24 Stunden annimmt. Aus dieser Abbildung sind nun mehrere Dinge zu ersehen. Einmal sind die Konzentrationen der hier aufgeführten Bestandteile im Plasma zum größten Teil nicht bekannt, da sie so niedrig liegen, daß sie mit den derzeitigen Methoden nicht erfaßt werden können. Betrachten wir aber nun das Adrenalin und das Noradrenalin, so liegen im Plasma die mittleren Konzentrationen um etwa  $10^3$  niedriger als im Urin, bei der Vanillinmandelsäure um  $2 \cdot 10^3$ . Außerdem sehen wir, daß die Konzentrationen im Urin je nach Verbindung im Mikro- oder Milligrammbereich liegen.

### Probengewinnung

Außer den erheblichen Konzentrationsunterschieden von Urin und Plasma ergeben sich weitere Unterschiede bei der Aufarbeitung der Proben. Wenn man von den Schwierigkeiten des vollständigen Sammelns eines 24-Stunden-Urins absieht, so ist — unter Einhaltung bestimmter Vorsichtsmaßnahmen wie kühle Lagerung, Ansäuern und evtl. Zugabe eines Reduktionsmittels — das Gewinnen der Urinproben im Verhältnis zu den Plasmaproben relativ unproblematisch. Bewahrt man angesäuerte Urinproben bei — 20 bis — 30°C auf, so tritt keine meßbare Veränderung der Katecholaminkonzentration auf, wie an selbst hergestellten Kontrollurinproben über einen Zeitraum von 12 Monaten festgestellt werden konnte (31). Bei Aufbewahrung von Plasmaproben bei — 20°C über einen Zeitraum von 11 bis 106 Stunden fanden CARRUTHERS et al. (32) eine Abnahme bis zu 70%, wobei kein einheitlicher Zusammenhang zwischen Verlust und Aufbewahrungszeit gefunden wurde. Läßt man die Plasmaproben bei Raumtemperatur stehen, so kommt es innerhalb relativ kurzer Zeit zu einem deutlichen Abfall der Katecholaminkonzentration. Sie beträgt nach 30 Minuten 25—30% (32).

Im Vollblut besteht auch ein Gleichgewicht der Adrenalin- und Noradrenalinkonzentration zwischen Plasma und Erythrocyten, wie von mehreren Untersuchern durch Inkubationsversuche mit radioaktiv markiertem Adrenalin gezeigt werden konnte. Innerhalb der ersten 30 Mi-

Tab. 1  
Katecholamin- und Metabolitenkonzentrationen in Plasma und Urin

| Bestandteil         | Plasma (Serum)         |                        | Literatur                    | Urin                      |                           | Literatur                                |
|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|--|
|                     | $\mu\text{g}/\text{l}$ | $\text{nmol}/\text{l}$ |                              | $\mu\text{g}/24\text{ h}$ | $\text{nmol}/24\text{ h}$ |  |
| Dopa                | —                      | —                      | —                            | 24                        | 122                       | VOORHES 1969; TÜRLE & KÄSER (23/24) 1971 |
| Dopamin             | —                      | —                      | —                            | 247                       | 1612                      | WISSER 1970 (25)                         |
| Noradrenalin        | 0,20                   | 1,18                   | ENGELMAN & PORTNOY 1970 (26) | 43                        | 254                       | WISSER 1970 (25)                         |
| Adrenalin           | 0,05                   | 0,27                   | ENGELMAN & PORTNOY 1970 (26) | 6,1                       | 33                        | WISSER 1970 (25)                         |
| Normetanephrin      | —                      | —                      | —                            | 175                       | 955                       | GEISSBUHLER 1970 (27)                    |
| Metanephrin         | —                      | —                      | —                            | 133                       | 674                       | GEISSBUHLER 1970 (27)                    |
| Vanillinmandelsäure | 2,6                    | 13,1                   | O'GORMAN 1968 (28)           | 4900                      | 24726                     | WISSER & STAMM 1970 (29)                 |
| Homovanillinsäure   | —                      | —                      | —                            | 3300                      | 18114                     | KNOLL, WISSER & STAMM 1971 (30)          |

nuten erfolgt der Eintritt in die Erythrocyten sehr rasch. Nach einer Stunde beträgt das Verhältnis der Aktivität Plasma zu Erythrocyten 3:2 (33). Dieses Gleichgewicht ist zu berücksichtigen bei Versuchen mit internem Standard und Vollblut, ebenso eine mögliche Temperaturabhängigkeit des Gleichgewichtes beim Abtrennen der Erythrocyten vom Plasma.

### Störeinflüsse durch Medikamente

Neben den aufgeführten Störmöglichkeiten bei der Probengewinnung ist der Einfluß von Medikamenten zu berücksichtigen. Dieser Störeinfluß kann auf verschiedene Weisen zustande kommen. So können bei den fluorometrischen Bestimmungen Medikamente direkt durch ihre Eigenfluoreszenz, z. B. Tetracycline, zu einer Fluoreszenzerhöhung oder durch Störung der ablaufenden chemischen Reaktion bei der Bildung des Fluorophors (34) zu einer Fluoreszenzlöschung führen. Weiterhin können sie im Organismus zu Substanzen abgebaut werden, die ihrerseits dann zu einer der beiden aufgeführten Störungen führen. Eine weitere Möglichkeit des Störeinflusses ergibt sich durch Eingriff einer zugeführten Substanz in den Katecholaminstoffwechsel, wie dies z. B. Monoaminoxidase-Inhibitoren tun. In diesem Zusammenhang sei auf Übersichtsarbeiten von LUBRAN (35) sowie WIRTH und THOMPSON (36) verwiesen.

Es soll nun auf die Analytik der oben genannten Verbindungen eingegangen werden. Aus Übersichtsgründen wird bei den verschiedenen Methoden zwischen Trenn- und Bestimmungsverfahren unterschieden, wobei die Trennverfahren zuerst behandelt werden.

### Trennverfahren

Aus naheliegenden Gründen ist eine direkte Bestimmung der Katecholamine und ihrer Metabolite im Urin und Plasma ohne Abtrennung nicht möglich. Zur Abtrennung kommen — wie die nächste Tabelle zeigt — Lösungsmittelverteilung, Ionenaustauschchromatographie und Adsorption an Aluminiumoxid zur Anwendung (37; 38).

Diese Art der Vortrennung erfüllt zwei Funktionen, einmal Abtrennung von Störsubstanzen, zum anderen Anreicherung der zu bestimmenden Substanzen. Die Methode der Lösungsmittelverteilung wird in erster Linie zur Abtrennung der sauren Metabolite aus dem

Harn benutzt, wobei der auf pH 1 eingestellte Urin mit Äthylacetat oder Diäthyläther ausgeschüttelt wird. Die Phenolcarbonsäuren gehen dabei in die organische Phase über und können durch Rückschütteln mit einer geringen Menge einer alkalischen Lösung in dieser angereichert werden. Zur Abtrennung der Amine aus dem Urin oder Plasma ist die Methode der Lösungsmittelverteilung wegen stark streuender und zum Teil niedriger Wiederfindung ungeeignet.

Zur Abtrennung aus Urin und Plasma werden Ionenaustauscher benutzt. Zu beachten ist, daß bei der Elution Substanzen miteluiert werden, die zu Quencheffekten bei der fluorometrischen Bestimmung führen können (39). Breiteste Anwendung zur Isolierung der Katecholamine hat die Adsorption bei pH 8,3–8,5 an Aluminiumoxid gefunden. Bei dieser Methode werden die Katecholamine und die Phenolcarbonsäuren, nicht aber die Metaneph- rine adsorbiert (13). Die Katecholamine werden anschließend z. B. mit verdünnter Essigsäure desorbiert, während zur Elution der Phenolcarbonsäuren stärker konzentrierte Säuren erforderlich sind (13).

Da es sich bei diesen Trennverfahren — mit Einschränkung — nur um eine Gruppentrennung handelt, ist je nach Spezifität des nachfolgenden Bestimmungsverfahrens und der Zusammensetzung der zu analysierenden Probe unter Umständen eine weitere Auftrennung erforderlich. Bekanntlich ist der Dihydroxyphenylkern (Brenzkatechin) sehr instabil, so daß durch Autoxidation — insbesondere in alkalischer Lösung — bei unsachgemäßer Trennung erhebliche Verluste eintreten können. Zusatz von EDTA und Ascorbinsäure zu der zu untersuchenden Lösung wurden als Schutzmaßnahmen empfohlen. Bei dünn- schichtchromatographischen Trennungen haben sich das Entwickeln der Platte in einer mit 2-Mercaptoäthanol gesättigten Kammer oder das Imprägnieren der Dünnschichtplatte mit Ascorbinsäure als Schutzmaßnahme bewährt (40). Zu beachten ist, daß bei der Dünnschichtchromatographie der Amine verschiedene Artefakte entstehen können (41). Von anderen Untersuchern wurden die Katecholamine nach ihrer Abtrennung in stabile Triacetyl-derivate überführt und anschließend eine weitere Auftrennung durchgeführt (42; 43; 44).

Eine Auftrennung der Katecholamine oder ihrer Abbau- produkte in die Einzelkomponenten ist mit Papier-, Dünnschichtchromatographie, Hochspannungselektrophorese, Ionenaustauschern und bei bestimmten Fragestellungen mit Aluminiumoxid sowie gaschromatographisch nach Derivatbildung möglich. Die hier erwähnten Verfahren zur Auftrennung in die Einzelkomponenten werden meist in Kombination mit einem der Vortrennverfahren benutzt.

### Bestimmungsverfahren:

#### Dopamin

Die verschiedenen Bestimmungsverfahren für Dopamin sind in folgender Tabelle zusammengefaßt.

Tab. 2

Trennverfahren bei der Bestimmung der Katecholamine und ihrer Metabolite

- I. Vor- bzw. Abtrennung
  1. Lösungsmittelverteilung
  2. Adsorption an Aluminiumoxid
  3. Ionenaustauschchromatographie
- II. Auftrennung in Einzelkomponenten
  1. Papierchromatographie
  2. Dünnschichtchromatographie (mit und ohne Anreicherung)
  3. Säulenchromatographie (Ionenaustauscher, Aluminiumoxid)
  4. Hochspannungselektrophorese
  5. Gaschromatographie

Tab. 3  
Bestimmungsverfahren für Dopamin

- I. Photometrische Bestimmung als Aminochrom-Natriumbisulfit Additionsverbindung
- II. Fluorometrische Bestimmung
  1. Äthylendiaminkondensation
    - a) in Lösung
    - b) nach papier- oder dünn-schichtchromatographischer Trennung
  2. Dihydroxyindolmethode — Oxidation mit
    - a) Jod
    - b) Mangandioxid
    - c) Natrium-meta-perjodat
- III. Gaschromatographische Bestimmung

Die photometrische Bestimmung von Dopamin (45) wird nur der Vollständigkeit wegen erwähnt. Sie bietet gegenüber den anderen Methoden keinen Vorteil. Die erste fluorometrische Bestimmungsmethode stammt von CARLSSON und WALDECK (46). Bei dieser wird Dopamin mit Jod oxidiert, die Reaktion durch Zusatz einer alkalischen Natriumsulfitlösung gestoppt und die Probe vor der fluorometrischen Bestimmung 10 min mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt. Das Anregungsmaximum des Fluorophors liegt bei 345 nm und das Emissionsmaximum bei 410 nm. Bei dieser Reaktion kommt es zur Bildung des 5,6-Dihydroxyindols. Von dieser Methode gibt es zahlreiche Modifikationen mit Reaktionszeiten zwischen 30 min und 24 h, ohne UV-Bestrahlung, mit (47) und ohne Erhitzen (48). Mit Kaliumhexacyanoferrat-[III] als Oxidationsmittel erhält man nur eine sehr schwache Fluoreszenzintensität (10). In dem von UUSPÄÄ (49) ausgearbeiteten Verfahren wird Mangandioxid als Oxidationsmittel und Zinksulfit als Reduktionsmittel benutzt. Die Einführung von Natrium-meta-perjodat als Oxidationsmittel (50) bedeutet einen echten Fortschritt; denn die Oxidationszeit beträgt bei dieser Methode nur 2 min und nach Abstoppen der Reaktion mit alkalischer Natriumsulfitlösung kann die Fluoreszenz sofort gemessen werden. Der entstehende Fluorophor ist nach Ansäuern der Lösung sehr stabil. Allerdings tritt — wie auf Grund eigener Erfahrungen bestätigt werden kann — bei längerem Verweilen des Dopaminfluorophors im Strahlengang des Fluorometers eine Photodissoziation ein (51). Ein indirektes Verfahren der Dopaminbestimmung besteht darin, daß zunächst mit der Methode der Äthylendiaminkondensation Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin als Summe bestimmt werden. Mit der Trihydroxyindol-Methode werden anschließend Adrenalin und Noradrenalin bestimmt. Das Dopamin wird dann aus der Differenz berechnet (52).

Von CLARK et al. (53) wurde ein gaschromatographisches Bestimmungsverfahren für Dopamin im Urin ausgearbeitet. Die Abtrennung erfolgt durch Adsorption an Aluminiumoxid. Das Eluat wird eingedampft, der Rückstand in wasserfreiem Äthylacetat mit Trifluoroacethydrid umgesetzt und das entstandene Trifluoroacetyl-derivat quantitativ mit einem Elektronen-Einfang-Detektor bestimmt. Die Wiederfindung dieses Verfahrens

beträgt allerdings nur 50% und die Streuung in der Serie 15%. Aussichtsreicher ist die Kombination Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Nach Umsatz des Dopamins, das aus Gewebeproben (0,1–250 mg) isoliert wurde, mit Pentafluoropropionsäureanhydrid konnten 3,2 pmol sicher nachgewiesen werden (54). Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens wird von den Autoren mit 0,5 pmol angegeben.

#### Adrenalin und Noradrenalin

In den Anfängen der Katecholaminanalytik fanden biologische Bestimmungsverfahren breite Anwendung (55). Mit Hilfe verschiedener Organpräparate war eine getrennte Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin möglich. Auf Einzelheiten soll nicht eingegangen werden, da diese Methoden heute weitgehend durch physikalisch-chemische Verfahren verdrängt sind.

Von den in Tabelle 4 aufgeführten Methoden sollen die fluorometrischen und die radiochemischen Verfahren näher besprochen werden, die ersteren, weil sie bisher breiteste Anwendung gefunden haben, und die letzteren wegen ihrer Bedeutung für die Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin im Plasma. Hinsichtlich der photometrischen Bestimmung wird auf die Ausführungen über die Dopaminbestimmung verwiesen. Bei der fluorometrischen Bestimmung unterscheidet man zwei Methoden, die Äthylendiaminmethode und die Trihydroxyindolmethode. Bei der Äthylendiaminmethode werden die Katecholamine mit Kaliumhexacyanoferrat-[III] oxidiert und anschließend mit Äthylendiamin in ein Chinoxalinderivat (Adrenalin) bzw. ein Tetraazaanthracenderivat (Noradrenalin) überführt (56, 57). Diese Verbindungen haben fluoreszierende Eigenschaften. Bei der Trihydroxyindolmethode werden die Katecholamine über Orthochinone als Zwischenprodukte unter Ringschluß zu den Adrenochromen oxidiert, die dann in

Tab. 4  
Bestimmungsverfahren für Adrenalin und Noradrenalin

- I. Biologisch
- II. Photometrisch  
(als Aminochrom-Natriumbisulfit Additionsverbindung)
- III. Fluorometrisch
  1. Kondensation mit Äthylendiamin  
(nach Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat-[III])
    - a) in Lösung
    - b) nach papier- oder dünn-schichtchromatographischer Trennung der Triacetyl-derivate
  2. Trihydroxyindolmethode  
(Oxidation mit Jod oder Kaliumhexacyanoferrat-[III] und Isomerisierung in alkalischer Lösung unter Zusatz eines Reduktionsmittels)  
getrennte Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin durch:
    - a) Oxidation bei zwei verschiedenen pH-Werten („zwei-pH-Methode“)
    - b) Unterschiede der Anregungs- und Emissionsspektren („zwei-Filtermethode“)
    - c) Unterschiede des stabilisierenden Einflusses verschiedener Reduktionsmittel (Ascorbinsäure, Dimercaptopropanol, 2-Mercaptoäthanol, Diäthylthiocarbamat) („zwei-Reduktionsmittel-Methode“)
- IV. Gaschromatographisch
- V. Radiochemisch

alkalischer Lösung unter Zusatz eines Reduktionsmittels zu Trihydroxyindolderivaten isomerisieren. Anschließend Einstellung des pH-Wertes auf etwa 5,0 stabilisiert die Fluorophore (58).

Die getrennte Bestimmung der Katecholamine kann auf verschiedene Weise erfolgen. Bei der Bestimmung im Plasma mit der Äthylendiaminmethode wird sie durchgeführt — unter Vernachlässigung des bisher nicht erfaßbaren Dopamins — auf Grund der Unterschiede in den Spektren der Fluorophore (10). Die Dopaminausscheidung im Urin ist erheblich größer als die von Adrenalin und Noradrenalin. Ohne Auftrennung in die Einzelkomponenten erhält man mit der Äthylendiaminmethode nur die Summe der Katecholamine (52). Von verschiedenen Untersuchern wurde die Äthylendiaminmethode zur Adrenalin- und Noradrenalinbestimmung im Gehirngewebe bzw. im Urin nach papierchromatographischer Trennung der Triacetylderivate (42; 43) und anschließender Elution bzw. nach dünn-schichtchromatographischer Trennung und Fluoreszenzmessung auf der Platte (44) benutzt.

Die Trihydroxyindolmethode hat bisher für die Katecholaminbestimmung im Plasma und Urin die breiteste Anwendung gefunden. Die getrennte Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin ist möglich auf Grund der Unterschiede in den Spektren der Fluorophore (10, 59, 60), des stabilisierenden Einflusses verschiedener Reduktionsmittel, z. B. Ascorbinsäure und Thioglykolsäure, Dimercaptopropanol oder 2-Mercaptoäthanol (61, 62, 63, 64) oder der pH-Abhängigkeit der Oxidation (34, 38, 58). Von den hier aufgeführten Methoden ist die letztere die am wenigsten störanfällige in Bezug auf die gegenseitige Beeinflussbarkeit der Meßwerte. Von mehreren Untersuchern wurden teilmechanisierte Bestimmungsverfahren ausgearbeitet (25, 61, 62, 65–70).

Die Äthylendiamin- und Trihydroxyindolmethode unterscheiden sich in ihrer Spezifität und Empfindlichkeit. Während mit dem Äthylendiamin alle Dihydroxyphenylverbindungen reagieren, werden mit der Trihydroxyindolmethode in der Hauptsache Dihydroxyphenylverbindungen, die eine Seitenkette mit einer Hydroxyl- und Aminogruppe tragen, erfaßt (71). Die letztere Methode ist also spezifischer, hat aber den Nachteil, daß sie weniger empfindlich ist. Über gaschromatographische Bestimmungsverfahren von Adrenalin und Noradrenalin gibt es eine Reihe von Mitteilungen, von denen der größte Teil sich allerdings auf die Analyse reiner Lösungen beschränkt. Da die Amine selbst nicht flüchtig sind, müssen sie in entsprechende Derivate überführt werden. Dazu wurden die Trimethylsilyläther benutzt (72), bzw. die primären Amine durch Reaktion mit Pentafluorobenzaldehyd in die entsprechende Schiff'sche Base und anschließend mit bis-Trimethylsilyl-acetamid silyliert (73). Mit dem letzteren Derivat ist die Anwendung des Elektronen-Einfang-Detektors möglich und damit eine erheblich höhere Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens gegeben. Allerdings wurde dieses vorgeschlagene Verfahren auch nur bei reinen Lösungen

erprobt. Hinsichtlich der Anwendung von Gaschromatographie-Massenspektrometrie nach Umsatz mit Pentafluoropropionsäureanhydrid (54) wird auf die Ausführungen über die gaschromatographische Bestimmung des Dopamins verwiesen.

Für die Katecholaminbestimmung im Urin ist die Empfindlichkeit und Spezifität der fluorometrischen Methoden bei physiologischen Ausscheidungsverhältnissen ausreichend, wie eine vergleichende Untersuchung von ENGELMANN et al. (74) mit der noch zu besprechenden Doppelisotopenderivatmethode zeigen konnte. Die normale Konzentration im Plasma ist allerdings so niedrig, daß mit Sicherheit für das Adrenalin die Nachweisgrenze der fluorometrischen Methode erreicht wird. Nach UDENFRIEND (10) ist es auch mit keiner der gängigen fluorometrischen Methoden möglich, die wirkliche Plasma-Noradrenalin-Konzentration im Normalbereich zu bestimmen.

Die Doppelisotopenderivatmethode ermöglicht sowohl durch ihre Spezifität als auch Empfindlichkeit eine Katecholaminbestimmung im Plasma. Außerdem dürfte sie als Referenzmethode für die fluorometrischen Verfahren von Bedeutung sein. Bei dieser Methode (26, 74) werden die Katecholamine nach Zusatz von tritiiertem Adrenalin und Noradrenalin als internen Standards — zur Korrektur der Verluste während des Bestimmungsverfahrens — durch Ionenaustauscher abgetrennt. Mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem S-Adenosylmethionin werden diese unter Zusatz von Catecholamin-O-Methyltransferase (EC 2.1.1.6) in Metanephrin und Normetanephrin überführt. Diese Derivate werden dünn-schichtchromatographisch getrennt, eluiert und durch Oxidation mit Natrium-meta-perjodat in Vanillin bzw. Isovanillin überführt und durch Ausschütteln mit Toluol isoliert. Die Messung der  $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Aktivität erfolgt in einem Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer. Die Vorteile dieses Verfahrens sind die Möglichkeit einer Absolutbestimmung, die große Empfindlichkeit, die abhängig ist von der spezifischen Aktivität des Reagenz, den Leerwerten, sowie die automatische Korrektur der Verluste mit Hilfe des internen Standards. Nachteilig sind die große Anzahl von Trennschritten und das mehrmalige Lyophilisieren.

Das im gleichen Zeitraum publizierte Verfahren von SIGGERS et al. (75) unterscheidet sich von dem vorhergehenden dadurch, daß Normetanephrin und Metanephrin durch Dünnschichtelektrophorese getrennt werden und ohne Überführung in Vanillin die  $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Aktivität bestimmt wird.

BLAEDEL und ANDERSON (76) haben mit ihren Versuchen zeigen können, daß eine radiochemische Bestimmung von Noradrenalin über ein  $^{125}\text{J}$ -markiertes Jodaminochrom möglich ist. Bei der Adrenalinbestimmung stört das Dopamin. Das ganze Verfahren scheint aber in einigen Punkten nicht ausgereift zu sein.

#### Metanephrin und Normetanephrin

Die Angaben über die normale Ausscheidung dieser Metabolite differieren z. T. erheblich (14). Diese Tat-

Tab. 5

## Bestimmungsverfahren für Metanephrin und Normetanephrin

- I. Bestimmung der Summe von Metanephrin und Normetanephrin
  1. Photometrisch
  2. Gaschromatographisch
- II. Getrennte Bestimmung von Metanephrin und Normetanephrin
  1. Fluorometrisch
    - a) Oxidation bei verschiedenen pH-Werten („zwei-pH-Methode“)
    - b) Unterschiede in den optischen Eigenschaften („zwei-Filtermethode“)
    - c) nach Trennung mit Ionenaustauscher
  2. Photometrisch nach Auftrennung in die Einzelkomponenten
    - a) Kupplung zu einem Azofarbstoff
    - b) Oxidation zu Vanillin
  3. Gaschromatographisch (Trifluoroacetyl-derivate)
  4. Radioimmunologisch

sache zeigt, daß ihre Analytik nicht ohne Problematik ist.

Neben der photometrischen Methode zur Bestimmung der Summe der beiden Amine sowie fluorometrischen Verfahren, sind in jüngster Zeit gaschromatographische Verfahren zu ihrer Bestimmung entwickelt worden. Da 80% der im Urin ausgeschiedenen Menge in konjugierter Form ausgeschieden werden, wird der Urin meist einer Säurehydrolyse unterworfen. Diese Hydrolyse ist ein Grund für die Schwierigkeiten bei ihrer Bestimmung.

Bei der photometrischen Bestimmung der Summe von Metanephrin und Normetanephrin nach PISANO (77) werden die zu bestimmenden Verbindungen mit einem Ionenaustauscher abgetrennt, mit Ammoniak eluiert, mit Natrium-meta-perjodat zu Vanillin oxidiert und dessen Extinktion bei 360 nm bestimmt. Die u. a. infolge stark streuender Leerwerte geringe Empfindlichkeit macht diese Methode für Messungen im Normalbereich ungeeignet. VAN DE CALSEYDE et al. (78) haben ein gaschromatographisches Bestimmungsverfahren erarbeitet, wobei die sauren Metabolite abgetrennt werden und nach Oxidation mit Natrium-meta-perjodat das entstandene Vanillin als Trimethylsilyläther gaschromatographisch bestimmt wird. Der von diesen Autoren angegebene Normalbereich der Ausscheidung im 24-Stunden-Urin stimmt mit den Angaben von PISANO überein.

Die fluorometrische Bestimmung der Metanephrine zeigt große Ähnlichkeiten mit der Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin. Dies ist dadurch bedingt, daß Anregungs- und Emissionsspektren von Metanephrin und Normetanephrin sich von denen des Adrenalins, bzw. Noradrenalins praktisch nicht unterscheiden. Dies soll dadurch bedingt sein, daß bei der Oxidation eine Demethylierung der Metanephrine in Stellung 3 eintritt, so daß die Fluorophore ebenfalls Trihydroxyindolderivate darstellen (14). Als Oxidationsmittel wurden Jod-Kaliumjodid (14, 79, 80), Natrium-meta-perjodat (27, 81), sowie Kaliumhexacyanoferrat-[III] (14, 82) benutzt. Die Tatsache der Gleichheit in den optischen Eigenschaften macht eine vorherige Abtrennung von Adrenalin und Noradrenalin notwendig. Dazu wurden verschiedene Verfahren ausgearbeitet. Benutzt man die Adsorption an Aluminiumoxid bei

pH 8,5, werden die 3-O-Methyl-derivate nicht adsorbiert (13). Nach Entsalzung des Filtrats durch Elektrodialyse werden die Metanephrine mit Hilfe eines Ionenaustauschers abgetrennt (14). Eine andere Möglichkeit ihrer Abtrennung besteht in der fraktionierten Elution mit verschiedenen Lösungsmitteln von einem Ionenaustauscher (27, 83). ANTON und SAYRE (81) versuchten die Schwierigkeiten der Abtrennung mit Ionenaustauschern zu umgehen und trennten die Metanephrine durch Ausschütteln bei pH 10 mit Diäthyläther ab. Störende Pigmente, die bei der Hydrolyse des salzsauren Urins entstehen, wurden durch vorheriges Ausschütteln mit Isoamylalkohol entfernt.

Die getrennte Bestimmung der Metanephrine erfolgt bei Nichtauftrennung in die Einzelkomponenten durch Oxidation bei verschiedenen pH-Werten (14, 81) oder auf Grund der Unterschiede in den optischen Eigenschaften der Fluorophore (79).

Die fluorometrische Bestimmung der Metanephrine ist relativ aufwendig und infolge zusätzlicher Trennschnitte sind verminderte Wiederfindungen und eine größere Streuung zu erwarten. So wurde von WEIL-MALHERBE und SMITH (14) die Spannweite für die Wiederfindung bei Metanephrin mit 42–100% ( $\bar{x} = 71\%$ ), beim Normetanephrin mit 35–96% ( $\bar{x} = 64\%$ ) angegeben. Was die photometrische Bestimmung nach einer Vortrennung durch Lösungsmittelverteilung (84) oder Ionenaustauscher (85, 86) und anschließende papierchromatographische Auftrennung in Metanephrin und Normetanephrin betrifft, so dürfte sie ebenfalls für Messungen im Normalbereich zu unempfindlich sein.

Bei der gaschromatographischen Bestimmung von BERTANI et al. (87) werden die Basen mit Trifluoroacethydrid umgesetzt. Das Einführen von Halogen in das zu bestimmende Molekül ermöglicht die Anwendung des hochempfindlichen Elektronen-Einfang-Detektors. Diese Methode scheint hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit und Präzision nach den von den Autoren gefundenen Werten sowie wegen des im Verhältnis zu den fluorometrischen Verfahren relativ geringen Arbeitsaufwandes und der Möglichkeit, beide Verbindungen getrennt zu bestimmen, das z. Zt. beste Verfahren zu sein.

In jüngster Zeit wurden Versuchsergebnisse publiziert (88), die eine radioimmunologische Bestimmung der Metanephrine möglich erscheinen lassen, wenn auch die Empfindlichkeit des Verfahrens noch nicht sehr hoch ist und Ergebnisse von Analysen biologischen Materials nicht mitgeteilt wurden.

#### Bestimmungen der 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure (Vanillinmandelsäure)

Das Hauptabbauprodukt von Adrenalin und Noradrenalin ist beim Menschen die 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure.

Bei fast allen Methoden wird die Vanillinmandelsäure mit anderen in der Lösung vorhandenen Phenolcarbonsäuren durch Ausschütteln des auf etwa pH 1 angesäuerten Urins mit Äthylacetat oder Diäthyläther abge-



Tab. 6

## Bestimmungsverfahren der 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure (Vanillinmandelsäure)

- I. Photometrisch nach Kupplung zu einem Azofarbstoff
- II. Oxidativer oder fermentativer Abbau der Vanillinmandelsäure zu Vanillin und dessen Messung:
  1. Photometrisch bei 360 nm
  2. Photometrisch nach Umsatz mit Indol (495 nm)
  3. Photometrisch als 2,4-Dinitrophenylhydrazon (480 nm)
  4. Gaschromatographisch nach Umsatz mit Trifluoroessigsäure-anhydrid
- III. Gaschromatographische Bestimmung als Trimethylsilyl-ester-Trimethylsilyläther, Methyl-ester-Methyläther, bzw. Trimethylsilyläther-Methylester
- IV. Radiochemische Bestimmungsmethoden:
  1. Isotopenverdünnung
  2. Isotopen-Derivat-Methode

trennt. Je nach der Spezifität des anschließenden Bestimmungsverfahrens sind weitere Trennschritte erforderlich. Ionenaustauschchromatographie alleine oder in Kombination mit einer Lösungsmittelverteilung wurden seltener angewandt. In Tabelle 6 sind die Bestimmungsverfahren zusammengefaßt.

Bekanntermaßen kuppeln Phenole und deren Derivate, die Phenolcarbonsäuren, in alkalischer Lösung mit Diazoniumsalzen zu Azofarbstoffen. Bei Auftrennung des mit der Lösungsmittelverteilung erhaltenen Phenolcarbonsäurengemisches in die Einzelkomponenten durch Papier-(3, 4), Dünnschicht-(89, 90) oder Ionenaustauschchromatographie (91, 92), sowie Hochspannungselektrophorese (93), Elution und anschließende Farbstoffbildung hat dieses Verfahren die notwendige Spezifität. Es sei darauf hingewiesen, daß es insbesondere bei der Elution von der Dünnschichtplatte zu Störungen bei der Farbstoffbildung kommen kann. Am häufigsten wird als Kupplungskomponente das Diazoniumsalz des *p*-Nitroanilins benutzt. Störungen der Trennung durch diätetisch bedingte erhöhte Phenolcarbonsäureausscheidung oder Medikamenteneinflüsse sind zu berücksichtigen. Methoden, die nur Lösungsmittelverteilungen zur Abtrennung benutzen und ohne weitere Trennschritte die Kupplung durchführen, sind unspezifisch. Dies erkennt man leicht an den angegebenen Normalwerten der Vanillinmandelsäureausscheidung im 24 h-Urin (94), die teilweise um den Faktor 2–3 höher liegen als die mit spezifischen Methoden bestimmten.

Die in der Praxis am häufigsten angewandten Methoden benutzen mehr oder minder spezifische Verfahren zum Abbau der Vanillinmandelsäure in Vanillin. Das Vanillin, der 3-Methoxy-4-hydroxy-benzaldehyd, kann, wie aus Tabelle 6 ersichtlich, auf verschiedene Weise bestimmt werden; einmal durch Messung der Extinktion in alkalischer Lösung bei 360 nm (95) oder nach Umsatz mit Indol bei 495 nm (96), als 2,4-Dinitrophenylhydrazon bei 480 nm (97) oder gaschromatographisch als Trifluoroacetyl-derivat (98), wobei die Acylierung in Stellung 4 erfolgt. Der Abbau der Vanillinmandelsäure kann fermentativ mit Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (97) oder einer Fermentkombination von L-Mandelsäuredehydrogenase (EC 1.1. . .) und einer Decarboxylase (99) erfolgen. Da die genannten

Enzyme aber nicht spezifisch sind, haben sie gegenüber selektiven Oxidationsverfahren keinen Vorteil. Der oxidative Abbau der Vanillinmandelsäure wird in saurer Lösung mit Kaliumhexacyanoferrat-[III] (96) oder in alkalischer Lösung mit Natrium-meta-perjodat (95) durchgeführt. Die Isolierung des Vanillins erfolgt durch Ausschütteln in Toluol und Rückschütteln in eine Kaliumcarbonat(1 mol/l)-Lösung. Vanillin hat in alkalischer Lösung ein Absorptionsmaximum bei 347 nm. Die Extinktion wird aber bei 360 nm gemessen, da aus der mitabgetrennten *p*-Hydroxy-mandelsäure *p*-Hydroxybenzaldehyd entsteht, der zwischen 330 und 335 nm sein Absorptionsmaximum hat. Durch Messung bei 360 nm kann dieser Störeinfluß weitgehend verringert werden. Allerdings haben VAN DE CALSEYDE et al. (78) in einem Methodenvergleich zeigen können, daß die so erhaltenen Vanillinmandelsäurewerte im Vergleich zu gaschromatographisch bestimmten Werten bis zu 15% zu hoch bestimmt sein können. Vergleicht man allerdings die von diesen Autoren angegebenen Normalwerte mit denen von KAROUM et al. (100) — ebenfalls gaschromatographisch als Trimethylsilyläther-methylester bestimmt — so liegen sie gegenüber den letzteren erheblich niedriger. Für die photometrischen Verfahren spricht der geringe apparative Aufwand und die gute Präzision der Methode (29). Bei der apparativ aufwendigeren gaschromatographischen Bestimmung des Vanillins entfällt allerdings der Störeinfluß des *p*-Hydroxybenzaldehyds.

Eine direkte gaschromatographische Bestimmung der Vanillinmandelsäure ist nicht möglich, da sie selbst nicht flüchtig ist. Sie muß also in ein flüchtiges Derivat überführt werden. Dabei werden durch Umsatz mit Hexamethyldisilazan/Trimethylsilylchlorid oder Diazomethan einzeln oder in Kombination Trimethylsilyläther/Trimethylsilyl-ester oder Methyläther/Methylester gebildet (100, 101, 102, 103). Als Lösungsmittel werden Dioxan oder Pyridin benutzt. Die Derivatbildung erfolgt im wasserfreien Medium bei Raumtemperatur. Zu erwähnen ist, daß bei den Trimethylsilyläthern/Trimethylsilylestern die Detektorantwort (Flammenionisationsdetektor) zehnmal kleiner ist als bei den methylveresterten Derivaten. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Trimethylsilyläther eine geringere Ionisation zeigen (101). Voraussetzung für eine quantitative Bestimmung ist allerdings, daß nur ein Derivat entsteht, was nicht immer unbedingt gegeben ist. Die gaschromatographische Bestimmung hat den Vorteil, daß gleichzeitig mehrere Phenolcarbonsäuren nebeneinander bestimmt werden können, z. B. neben der Vanillinmandelsäure die Homovanillinsäure, was aus diagnostischen Gründen wünschenswert sein kann. Zum anderen ist dieses Verfahren spezifischer, wenn auch der Nachweis der Spezifität bei der Gaschromatographie nicht immer erbracht wird. Was die Präzision betrifft, so sind die photometrischen Verfahren der Gaschromatographie überlegen.

Für die routinemäßige Bestimmung der Ausscheidung im Urin sind radiochemische Methoden zu aufwendig. Sie sind von Bedeutung als Referenzverfahren zur Über-



prüfung der Richtigkeit oder zur Bestimmung sehr geringer Vanillinmandelsäurekonzentrationen z. B. im Blut. Bei der Isotopenverdünnung werden die Verluste während der Trennoperation durch Mitführen der markierten Vanillinmandelsäure als internem Standard korrigiert. Die Bestimmung der Vanillinmandelsäure selbst erfolgt bei dieser von WEISE et al. (91) angegebenen Methode photometrisch als Azofarbstoff nach Trennung mit einem Ionenaustauscher. Bei der Isotopenderivatmethode von O'GORMAN (28), der mit dem inaktiven Vanillinmandelsäurederivat als internem Standard arbeitet, erfolgt die Bestimmung durch Messung der Aktivität des Diacetoxyderivates der Vanillinmandelsäure.

#### Bestimmung der 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylelessigsäure (Homovanillinsäure)

Die 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylelessigsäure ist das Hauptabbauprodukt des Dopamins. Sie unterscheidet sich von der Vanillinmandelsäure durch das Fehlen der Hydroxylgruppe in  $\beta$ -Stellung der Seitenkette. Im Vergleich mit der Vanillinmandelsäure gibt es einige Gemeinsamkeiten bei der Bestimmung dieser Verbindung, so z. B. die Möglichkeit der Kupplung zu einem Azofarbstoff oder der Bildung von Trimethylsilyl- bzw. Methylderivaten zur gaschromatographischen Bestimmung, aber auch einige durch die chemische Struktur der Homovanillinsäure bedingte Unterschiede.

Die ersten Verfahren zur quantitativen Bestimmung im Urin wurden von RUTHVEN und SANDLER (104, 105) entwickelt. Mit Bromwasserstoff-Eisessig bzw. Kupferionen wird die mit einer Silicagel-Säule abgetrennte Homovanillinsäure durch Autoklavieren in 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure bzw. Vanillin überführt und diese photometrisch bestimmt. Nachteilig ist das umständliche und nur selektive Trennverfahren mit niedrigen Wiederfindungen von 30–40% bzw. nur 10%. Von anderen Autoren wurde die Homovanillinsäure nach papier- (3, 106, 107), dünn-schichtchromatographischer (90, 108, 109) bzw. hochspannungselektrophoretischer Trennung (110), Elution, Kupplung zu einem Azofarbstoff photometrisch bestimmt. Bei einem anderen Verfahren (30) wird die Homovanillinsäure nach einer Vortrennung durch Ausschütteln des angesäuerten Urins mit Äthylacetat und dünn-schichtchromatographischer Auftrennung der abgetrennten Phenol-

carbonsäuren quantitativ durch in situ Remissionsmessung bei 280 nm bestimmt. Die in situ Remissionsmessung vermeidet Störungen, wie sie bei Elution und anschließender Farbstoffentwicklung auftreten können. Das benutzte Laufmittelgemisch — die Oberphase eines Gemisches von Benzol/Eisessig/Wasser (21 + 21 + 11) — hat den Vorteil einer relativ kurzen Laufzeit. Allerdings ist eine saubere Abtrennung der Homovanillinsäure nur durch Mehrfachchromatographie möglich. Die Eichgerade, deren Steigung von Platte zu Platte variiert, muß durch Mitführen von 3 Standards für jede Platte neu bestimmt werden. Nachteilig ist sicherlich, daß eine Vorrichtung zur Remissionsmessung nicht zur Standard-einrichtung eines klinisch-chemischen Labors gehört. Das letztere gilt auch für das jüngst publizierte Verfahren von BREEBAART et al. (111), das im Prinzip dem vorhergehenden gleicht. Abweichend davon wird die Bestimmung nach zweidimensionaler Chromatographie und Ansprühen der Platte mit dem Diazoniumsalz des *p*-Nitroanilins durch in situ Remissionsmessung durchgeführt. Außerdem ist nur eine Bestimmung pro Platte möglich. Diese Modifikation bedeutet keine Verbesserung gegenüber dem ersten Verfahren.

Die fluorometrische Bestimmung der Homovanillinsäure ist sehr empfindlich und erlaubt neben ihrer Bestimmung im Urin (112, 113) auch die im Gewebe und Liquor cerebrospinalis (114). Sie beruht auf der oxidativen Kupplung der Homovanillinsäure zur 5,5'-bis-Homovanillinsäure. Diese Methode hat allerdings auch die Nachteile einer fluorometrischen Bestimmung, d. h. ihre Störanfälligkeit.

Was die gaschromatographische Bestimmung angeht, so gilt das bei der Vanillinmandelsäure Gesagte.

#### Die diagnostische Bedeutung der Bestimmung der Ausscheidung der Katecholamine und einiger Hauptabbauprodukte im Urin

Bei bestimmten Tumoren des sympathoadrenalen Systems kann es zu einer erhöhten Ausscheidung des Dopa, der Katecholamine und verschiedener Abbauprodukte kommen. Die genannten Tumoren leiten sich entwicklungsgeschichtlich von der Neuralleiste ab. Aus diesem Gewebe entwickeln sich sogenannte primitive sympathische Zellen, die sich in chromaffines Gewebe über Phäochromoblasten zu Phäochromocyten oder über Sympathoblasten weiter zu Sympathocyten differenzieren. Nach GJESSING (115) beträgt die Häufigkeit des Phäochromocytoms bei Hypertonikern 0,5 bis 0,6%. 80 bis 85% aller Tumoren gehen vom Nebennierenmark aus, und zwar sind sie rechts häufiger als links. In der Regel tritt der Tumor bei Erwachsenen zwischen 25 und 55 Jahren auf, seltener bei Kindern. Bei Erwachsenen ist er in 10% und bei Kindern in 25% der Fälle bilateral. In etwa 10% der Fälle handelt es sich um ein Phäochromoblastom, also die maligne Form dieses Tumors. Erwähnt sei, daß eine familiäre Häufung beobachtet wurde, sowie die Kombination mit der Neurofibromatose, dem Schilddrüsenkarzinom und der von HIPPEL-LINDAU'schen

Tab. 7

Bestimmungsverfahren für 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylelessigsäure (Homovanillinsäure)

- I. Photometrische Bestimmung nach:
  1. Kupplung zu einem Azofarbstoff
  2. Oxidativem Abbau zu Vanillin oder 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure
- II. Dünn-schichtchromatographische Trennung, Remissionsmessung ohne oder mit Anfärbung
- III. Fluorometrische Bestimmung durch oxidative Kupplung zu 5,5'-bis-Homovanillinsäure
- IV. Gaschromatographische Bestimmung als Trimethylsilylester-Trimethylsilyläther, Methyl ester-Methyläther oder Methyl ester-Trimethylsilyläther

Erkrankung. Das Neuroblastom ist der häufigste maligne Tumor des Kindesalters. 90% der Tumoren zeigen pathologische Veränderungen der Ausscheidung der Katecholamine oder ihrer Metabolite. Allerdings ist bei sogenannten biochemisch inaktiven Tumoren Vorsicht geboten (116).

Bestehen nun Unterschiede im Ausscheidungsmuster der genannten Tumoren? Auf Grund des unterschiedlichen Gehaltes der beiden Tumoren an Katecholaminen und ihrer Metabolite sind solche Unterschiede zu erwarten. Beim Neuroblastom werden in erster Linie die 3-O-methylierten Derivate des Dopa, Dopamins und Noradrenalins vermehrt ausgeschieden. Das sind 3-Methoxytyrosin, 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylbrenztraubensäure, 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylmilchsäure, Homovanillinsäure, 3-Methoxytyramin, Normetanephrin, Vanillinmandelsäure und 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylglykol. Beim Phäochromocytom ist die Ausscheidung von Noradrenalin oder Adrenalin, sowie deren Hauptabbauprodukten Metanephrin, Normetanephrin, Vanillinmandelsäure und 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylglykol (115) vermehrt. Es sei aber schon hier darauf hingewiesen, daß auf Grund des Ausscheidungsmusters der Katecholaminmetaboliten eine Differentialdiagnose Tumor des chromaffinen oder sympathischen Gewebes nicht möglich ist; denn bei dem Phäochromoblastom wird ebenfalls eine erhöhte Ausscheidung der 3-O-Methyl-derivate von Dopa, Dopamin und Noradrenalin gefunden, d. h. das Ausscheidungsmuster des Phäochromoblastoms ist dem des Neuroblastoms ähnlich. Welche Bestimmung hat nun die höchste Treffsicherheit in bezug auf die Diagnosestellung? Eine Antwort auf diese Frage gibt die Literaturzusammenstellung über die Ausscheidung verschiedener Metabolite beim Phäo-

chromocytom und Neuroblastom, die in den beiden folgenden Tabellen wiedergegeben wird.

Es handelt sich hierbei um Untersuchungen bei gesichertem Phäochromocytom. In der ersten Spalte sind die jeweiligen Untersucher und in der oberen Reihe die analysierten Bestandteile der Urinproben aufgeführt. Die erste Zahl bedeutet normale Ausscheidung und die zweite Zahl erhöhte Ausscheidung. Nach diesen Ergebnissen kommt der Bestimmung von Adrenalin und Noradrenalin, der Vanillinmandelsäure oder den Metanephrinen etwa die gleiche Treffsicherheit zu. Nach GITLOW et al. (121) liefert die Bestimmung der Metanephrinausscheidung weniger falsch negative Werte, aber auch mehr falsch positive Werte als die der Vanillinmandelsäure.

Tabelle 9 zeigt in der gleichen Anordnung die Ergebnisse für das Neuroblastom. In bezug auf die Vanillinmandelsäureausscheidung zeigt sich hier etwa die gleiche Treffsicherheit wie beim Phäochromocytom. Bezüglich der Metanephrinbestimmung scheint der Prozentsatz der falsch negativen Werte etwas höher zu sein als beim Phäochromocytom. Über den Wert der Bestimmung der Homovanillinsäure werden — wie auch die Ergebnisse zeigen — unterschiedliche Meinungen vertreten. So ist nach den Untersuchungen von v. STUDNITZ (110) die Vanillinmandelsäurebestimmung der Homovanillinsäurebestimmung überlegen. Nach den vorliegenden Ergebnissen kann man auf jeden Fall sagen, daß die Bestimmung der Ausscheidung der Vanillinmandelsäure der der Homovanillinsäure mindestens gleichwertig ist. Ohne Zweifel nimmt die Sicherheit der Diagnostik — insbesondere beim Neuroblastom (117) — zu, wenn man die Ausscheidung mehrerer Metabolite bestimmt; denn beim Phäochromocytom sind z. B. Fälle beschrieben, die

Tab. 8  
Die sekretorische Aktivität von Phäochromocytomen (normal/erhöht)

| Literatur                      | Dopamin | Homovanillin-säure | Adrenalin + Noradrenalin | Metanephrine | Vanillin-mandelsäure |
|--------------------------------|---------|--------------------|--------------------------|--------------|----------------------|
| V. STUDNITZ 1960 (93)          | —       | —                  | 1/12                     | —            | 1/12                 |
| CROUT et al. 1961 (117)        | —       | —                  | 0/23                     | 3/20         | 3/20                 |
| PETRAŠEK et al. 1966 (118)     | —       | 3/13               | —                        | —            | 0/16                 |
| SJOERDSMA et al. 1966 (119)    | —       | —                  | 2/60                     | 2/60         | 3/59                 |
| PERTSEMLIDIS et al. 1969 (120) | —       | —                  | —                        | 0/78         | 2/76                 |
| GITLOW et al. 1970 (121)       | 91/1    | 91/1               | —                        | 0/92         | 3/89                 |

Tab. 9  
Die sekretorische Aktivität von Neuroblastomen (normal/erhöht)

| Literatur                    | Dopa | Dopamin | Homo-vanillin-säure | Adrenalin + Noradrenalin | Metanephrine | Vanillin-mandelsäure | 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylglykol |
|------------------------------|------|---------|---------------------|--------------------------|--------------|----------------------|----------------------------------|
| VOORHES et al. 1961 (122)    | —    | —       | —                   | 1/5                      | —            | 2/4                  | —                                |
| V. STUDNITZ 1962 (110)       | —    | —       | 8/17                | —                        | —            | 1/24                 | —                                |
| KÄSER et al. 1963 (123)      | —    | —       | 3/16                | —                        | —            | 3/45                 | —                                |
| V. STUDNITZ et al. 1963 (47) | 3/18 | 1/20    | 8/9                 | 2/19                     | 1/20         | 0/21                 | —                                |
| KÄSER 1966 (124)             | —    | 2/32    | 12/24               | —                        | —            | 4/69                 | —                                |
| BELL 1966 (125)              | —    | —       | —                   | 5/21                     | 3/19         | 6/20                 | —                                |
| PETRAŠEK et al. 1966 (118)   | —    | —       | 0/18                | —                        | —            | 1/17                 | —                                |
| KÄSER et al. 1969 (116)      | —    | 0/10    | u. VMS<br>10/118    | —                        | —            | u. HVS<br>10/118     | —                                |
| GITLOW et al. 1970 (126)     | —    | —       | 3/34                | —                        | 4/27         | 2/35                 | 1/30                             |

eine normale Ausscheidung der Katecholamine, d. h. des Adrenalins und Noradrenalins, bei erhöhter Vanillinmandelsäureausscheidung und umgekehrtes Verhalten zeigen. Vergleichbare Befunde wurden beim Neuroblastom erhoben. Sieht man von den Fehlern bei der Analytik ab, so bieten sich verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für diesen Sachverhalt an (128, 129), die im Rahmen dieser Arbeit nicht besprochen werden können.

Andererseits ist zu beachten, daß mit nur 1% und weniger pathologischen Befunden bei den Einsendungen gerechnet werden kann, so daß ein breiteres analytisches Spektrum von vornherein zu aufwendig wäre. In den meisten Übersichten wird betont, daß mit einer einmaligen Bestimmung der Vanillinmandelsäure über 90% der Phäochromocytome erfaßt werden können. Da aber

beim Neuroblastom die Treffsicherheit der Vanillinmandelsäure gleich hoch ist, haben wir uns auch aus methodischen Überlegungen für die Bestimmung der Vanillinmandelsäureausscheidung in der Routinediagnostik entschieden. Bei Anwendung von sogenannten Screeningtesten ist Vorsicht geboten wie eine Untersuchung von SAPIRA et al. (130) zeigt. Als zusätzliche diagnostische Maßnahme bieten sich an: zusätzliche Bestimmung der Katecholamine und Metanephrine, Bestimmung an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen und Anwendung von sogenannten Provokationstesten, wie z. B. des Tyramintestes (131).

### Danksagung

Fräulein M. RUOPP danken wir für das sorgfältige Schreiben des Manuskriptes.

### Literatur

1. HOLTZ, P., HEISE, R. & LÜDTKE, K. (1938), Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Pathol. 191, 87—118. — 2. ARMSTRONG, M. D. & McMILLAN, A. (1957), Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 16, 146. — 3. ARMSTRONG, M. D., SHAW, K. N. F. & WALL, P. E. (1956), J. Biol. Chem. 218, 293—303. — 4. ARMSTRONG, M. D., McMILLAN, A. & SHAW, K. N. F. (1957), Biochim. Biophys. Acta, 25, 422—423. — 5. AXELROD, J. & TOMCHICK, R. (1958), J. Biol. Chem. 233, 702—705. — 6. AXELROD, J., SENOH, S. & WITKOP, B. (1958), J. Biol. Chem. 233, 697—701. — 7. HOLTZ, P. & PALM, D. (1966), Ergebnisse der Physiologie, Biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York. — 8. BUNNEY, W. E. & DAVIS, J. M. (1965), Arch. Gen. Psychiat. 13, 483—494. — 9. SCHILDKRAUT, J. J. & KETY, S. S. (1967), Science 156, 21—30. — 10. UDENFRIEND, S. (1964), Fluorescence Assay in Biology and Medicine, Academic Press, New York. — 11. WURTMAN, R. J. (1966), Catecholamines, Little, Brown and Company, Boston. — 12. HOLTZ, P., CREDNER, K. & KRONEBERG, G. (1944/1947), Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Pathol. 204, 228—243. — 13. WEIL-MALHERBE, H. (1964), diese Z. 2, 161—167. — 14. WEIL-MALHERBE, H. & SMITH, E. R. B. (1966), Pharmacol. Rev. 18, 331—341. — 15. STUDNITZ, W. v. (1971), Persönliche Mitteilung. — 16. EULER, U. S. v. & LUFT, R. (1951), Brit. J. Pharmacol. 6, 286—288. — 17. KIRSHNER, N., GOODALL, McC. & ROSEN, L. (1958), Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98, 627—630. — 18. EULER, U. S. v. (1956), Noradrenaline, Chemistry, Physiology, Pharmacology and Clinical Aspects, Thomas, Ch. C., Springfield (Ill.). — 19. MAAS, J. W. & LANDIS, D. H. (1968), J. Pharmacol. Exp. Ther. 163, 147—163. — 20. HOLTZ, P., CREDNER, K. & KOEPP, W. (1942), Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Exp. Pathol. 200, 356—388. — 21. SANDLER, M. & RUTHVEN, C. R. J. (1969), in Progr. in medicinal chemistry, (Ellis, G. P. & West, G. B., Hrsg.) 6, 200, London: Butterworth. — 22. WURTMANN, J. R. (1970), N. Engl. J. Med. 282, 45—46. — 23. VOORHES, M. L. (1969), VII. Internationaler Kongreß für klinische Chemie, Genf, Abstracts, 455. — 24. TÜRLER, K. & KÄSER, H. (1971), Clin. Chim. Acta 32, 41—51. — 25. WISSER, H. (1970), diese Z. 8, 637—648. — 26. ENGELMAN, K. & PORTNOY, B. (1970), Circ. Res. 26, 53—57. — 27. GEISSBUHLER, F. (1970), Clin. Chim. Acta 30, 143—148. — 28. O'GORMAN, L. P. (1968), Clin. Chim. Acta 19, 485—492. — 29. WISSER, H. & STAMM, D. (1970), diese Z. 8, 21—26. — 30. KNOLL, E., WISSER, H. & STAMM, D. (1971), diese Z., 9, 478—485. — 31. WISSER, H. (1971), Unveröffentlichte Versuche. — 32. CARRUTHERS, M., TAGGART, P., CONWAY, N., BATES, D., SOMERVILLE, W. (1970), Lancet II, 62—67. — 33. ZIMON, R. P., SHEPS, SH. G., HAZELRIG, C. G., SCHIRGER, A., OWEN, CH. A. (1966), Mayo Clin. Proc. 41, 649—656. — 34. CROUT, J. R. (1961), in Stand. Methods Clin. Chem. (Seligson, D., Hrsg.), 3, 62—80, Academic Press, New York and London. — 35. LUBRAN, M. (1969), Med. Clin. N. Amer. 53, 211—222. — 36. WIRTH, W. A. & THOMPSON, R. L. (1965), Amer. J. Clin. Pathol. 43, 579—590. — 37. KIRSHNER, N. (1968), in Hormone Research (Dorfman, R. J., Hrsg.), 1, 383—410, Academic Press, New York. — 38. WEIL-MALHERBE, H. (1968), in Methods of Biochemical Analysis (Glick, D., Hrsg.), 16, 294—326, Interscience Publishers, New York-London-Sidney-Toronto. — 39. HÄGGENDAL, J. (1962), Scand. J. Clin. Lab. Invest. 14, 537—544. — 40. KNOLL, E. (1971), Unveröffentlichte Versuche. — 41. FORREST, J. E., HEACOCK, R. A., ROBERTS, D. J. & FORREST, T. P. (1970), J. Chromatogr. 51, 525—533. — 42. LAVERTY, R. & SHARMAN, D. F. (1965), Brit. J. Pharmacol. 24, 538—548. — 43. LAVERTY, R. & SHARMAN, D. F. (1965), Brit. J. Pharmacol. 24, 759—772. — 44. GEISSLER, H. E. & MUTSCHLER, E. (1971), J. Chromatogr. 56, 271—279. — 45. MATTOCK, G. L., WILSON, D. L. & HEACOCK, R. (1966), Clin. Chim. Acta 14, 99—107. — 46. CARLSSON, A. & WALDECK, B. (1958), Acta Physiol. Scand. 44, 293—298. — 47. STUDNITZ, W. v., KÄSER, H. & SJOERDSMA, A. (1963), N. Eng. J. Med. 296, 232 bis 235. — 48. BISCHOFF, F. & TORRES, A. (1962), Clin. Chem. 8, 370—377. — 49. UUSPÄÄ, V. J. (1963), Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 41, 194—201. — 50. ANTON, A. H. & SAYRE, D. F. (1964), J. Pharmacol. Exp. Ther. 145, 326—336. — 51. BONITATI, J. (1970), Anal. Biochem. 38, 281—284. — 52. WEIL-MALHERBE, H. & BONE, D. (1957), J. Clin. Pathol. 10, 138—147. — 53. CLARKE, D. D., WILK, SH., GITLOW, ST. E. & FRANKLIN, M. J. (1967), J. Gas Chromatogr. 5, 307—310. — 54. KOSLOW, S. H., CATTABENI, F. & COSTA, E. (1972), Science 176, 177—180. — 55. GADDUM, J. H. (1959), Pharmacol. Rev. 2, 241—249. — 56. HARLEY-MASON, J. & LAIRD, A. H. (1959), Tetrahedron, 5, 70—76. — 57. WEIL-MALHERBE, H. (1960), Biochim. Biophys. Acta 40, 351—353. — 58. WEIL-MALHERBE, H. & BIGELOW, L. B. (1968), Anal. Biochem. 22, 321—334. — 59. BERTLER, A., CARLSSON, A. & ROSENGREN, E. (1958), Acta Physiol. Scand. 44, 273—293. — 60. EULER, U. S. v. & LISHAJKO, F. (1959), Acta Physiol. Scand. 45, 122—132. — 61. MERRILLS, R. J. (1962), Nature (London) 193, 988. — 62. MERRILLS, R. J. (1963), Anal. Biochem. 6, 272 bis 282. — 63. HÄGGENDAL, J. (1963), Acta Physiol. Scand. 59, 242—254. — 64. VOCHTEN, R. F. & SCHIAEPDRYVER, A. F. DE (1966), Experientia 22, 772—773. — 65. ROBINSON, R. L. & WATTS, D. T. (1965), Clin. Chem. 11, 986—997. — 66. HATHAWAY, P. W., JAKOI, L., TROYER, JR. W. G. & BOGDONOFF, M. D. (1967), Anal. Biochem. 20, 466—476. — 67. SAMPSON, P. A. (1967), Clin. Chem. 13, 806—807. — 68. VIKTORA, J. K., BAUKAL, A. & WOLFF, F. W. (1968), Anal. Biochem. 23, 513—528. — 69. MABRY, C. H. & WARTH, P. W. (1969), Amer. J. Clin. Pathol. 52, 57—68. — 70. WISSER, H. & STAMM, D. (1970), Fresenius' Z. Anal. Chem. 252, 98—104. — 71. PRICE, H. L. & PRICE, M. L. (1957), J.

- Lab. Clin. Med. 50, 769—777. — 72. CAPELLA, P. & HORNING, E. C. (1966), Anal. Chem. 38, 316—321. — 73. MOFFAT, A. C. & HORNING, E. C. (1970), Anal. Letters 3 (4), 205—216. — 74. ENGELMAN, K., PORTNOY, B. & LOVENBERG, W. (1968), Amer. J. Med. Sci. 255, 259—268. — 75. SIGGERS, D. C., SALTER, C. & TOSELAND, P. A. (1970), Clin. Chim. Acta 30, 373—376. — 76. BLAEDEL, W. J. & ANDERSON, T. J. (1971), Anal. Chem. 43, 521—529. — 77. PISANO, J. J. (1960), Clin. Chim. Acta 5, 406—414. — 78. CALSEYDE, J. F. VAN DE, SCHOLTIS, R. J. H., SCHMIDT, N. A. & LEYTEN, C. J. J. A. (1971), Clin. Chim. Acta 32, 361—366. — 79. BERTLER, A., CARLSSON, A. & ROSENGREN, E. (1959), Clin. Chim. Acta 4, 456—457. — 80. HÄGGENDAHL, J. (1962), Acta Physiol. Scand. 56, 258—266. — 81. ANTON, A. H. & SAYRE, D. F. (1966), J. Pharmacol. Exp. Ther. 153, 15—29. — 82. SMITH, E. R. B. & WEIL-MALHERBE, H. (1962), J. Lab. Clin. Med. 60, 212—223. — 83. TANIGUCHI, K., KAKIMOTO, Y. & ARMSTRONG, M. D. (1966), in Recent Results in Cancer Research, Neuroblastomas, Biochemical Studies, (Bohuon, C., Hrsg.) 1—16. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York. — 84. KRAUPP, O., BERNHEIMER, H. & PAPISTAS, D. (1961), Clin. Chim. Acta 6, 851—860. — 85. COWARD, R. F. & SMITH, P. (1966), Clin. Chim. Acta 14, 672—678. — 86. STOTT, A. W. & ROBINSON, R. (1966), J. Clin. Path. 19, 487—590. — 87. BERTANI, L. M., DZIEDZIC, S. W., CLARKE, D. D. & GITLOW, S. E. (1970), Clin. Chim. Acta 30, 227—233. — 88. PESKAR, B. A., PESKAR, B. M. & LEVINE, L. (1972), Eur. J. Biochem. 26, 191—195. — 89. SCHMID, E. & HENNING, N. (1963), Klin. Wochenschrift 41, 566—567. — 90. SCHMID, E., LAUDI, B., KRAUTHEIM, J. & TAUTZ, N. A. (1966), diese Z., 4, 250—256. — 91. WEISE, V. K., McDONALD, R. K. & LABROSSE, E. H. (1961), Clin. Chim. Acta 6, 79—86. — 92. MILLS, G. C. (1965), Tex. Rep. Biol. Med. 23, 753—761. — 93. STUDNITZ, W. v. (1960), Scand. J. Clin. Invest. 12, Suppl. 48, 1—73. — 94. WOIDWOD, A. J. & KNIGHT, R. (1961), J. Clin. Pathol. 14, 502—504. — 95. PISANO, J. J., CROUT, J. R. & ABRAHAM, D. (1962), Clin. Chim. Acta 7, 285—291. — 96. SUNDERMAN, F. W. JR., CLEVELAND, P. D., LAW, N. C. & SUNDERMAN, F. W. (1960), Amer. J. Clin. Pathol. 34, 293—312. — 97. GUTTERIDGE, J. M. C. (1970), Clin. Chim. Acta 28, 311—316. — 98. WILK, SH., GITLOW, ST. E., MENDLOWITZ, M., FRANKLIN, M. J., CARR, H. E. & CLARKE, D. D. (1965), Anal. Biochem. 13, 544—551. — 99. ROSANO, C. L. (1964), Clin. Chem. 10, 673—677. — 100. KAROUM, F., ANAH, C. O., RUTHVEN, C. R. J. & SANDLER, M. (1969), Clin. Chim. Acta 24, 341—348. — 101. KAROUM, F., RUTHVEN, C. R. J. & SANDLER, M. (1968), Clin. Chim. Acta 20, 427—437. — 102. KAROUM, F. & SANDLER, M. (1971), Clin. Chim. Acta 32, 391—397. — 103. DALGLIESH, C. E., HORNING, E. C., HORNING, M. G., KNOX, K. L. & YARGER, K. (1966), Biochem. J. 101, 792—810. — 104. RUTHVEN, C. R. J. & SANDLER, M. (1964), Anal. Biochem. 8, 282—292. — 105. RUTHVEN, C. R. J. & SANDLER, M. (1966), Clin. Chim. Acta 14, 511—518. — 106. DUKE, PH. S. & DEMOPOULOS (1968), Clin. Chem. 14, 212—221. — 107. COMOY, E., BRUNELLE, PH. & PARRAD, B. (1966), Ann. Biol. Clin. (Paris), 24, 655—662. — 108. SANKOFF, J. & SOURKES, T. L. (1963), Canad. J. Biochem. 41, 1381—1388. — 109. TAUTZ, N. A., VOLTMER, G. & SCHMID, E. (1965), Klin. Wochenschr. 43, 233—235. — 110. STUDNITZ, W. v. (1962), Klin. Wochenschr. 40, 163—167. — 111. BREEBAART, K., HAAN, A. M. F. H. & WADMAN, S. K. (1972), Clin. Chim. Acta 37, 157—164. — 112. SATO, T. L. (1965), J. Lab. Clin. Med. 66, 517—525. — 113. KAHANE, Z. & VESTERGAARD, P. (1971), Clin. Chim. Acta 35, 49—52. — 114. ANDÉN, N. E., ROOS, B. E. & WERDINIUS, B. (1963), Life Sci. 2, 448—458. — 115. GJESSING, L. R. (1968), in Advan. Clin. Chem. (BODANSKI, O. & STEWART, C. P., Hrsg.), 11, 81—131, Academic Press, New York & London. — 116. KÄSER, H., WAGNER, H. P. & KÜFFER, F. (1969), Helv. Paediat. Acta, 24, 128—134. — 117. CROUT, J. R., PISANO, J. J. & SJOERDSMA, A. (1961), Amer. Heart J. 61, 375—381. — 118. PETRÁŠEK, J., DUBORSKY, J. & CHARVÁT, J. (1966), Endokrinologie 50, 308—316. — 119. SJOERDSMA, A., ENGELMAN, K., WALDMANN, TH., COOPERMAN, L. H. & HAMMOND, W. G. (1966), Ann. Intern. Med. 65, 1302—1326. — 120. PERTSEMLIDIS, D., GITLOW, S. E., SIEGEL, W. C. & KARK, A. E. (1969), Ann. Surg. 169, 376—385. — 121. GITLOW, ST. E., MENDLOWITZ, M. & BERTANI, L. M. (1970), Amer. J. Cardiol. 26, 270—279. — 122. VOORHES, M. L. & GARDNER, L. J. (1961), J. Clin. Endocrinol. Metab. 21, 321—335. — 123. KÄSER, H., SCHWEISGUTH, O., SELLEI, K. & SPENGLER, G. A. (1963), Helv. Med. Acta 30, 628—639. — 124. KÄSER, H. (1966), Pharmacol. Rev. 18, 659—665. — 125. BELL, M. (1966), in Recent Results in Cancer Research, Neuroblastomas, Biochemical Studies, (Bohuon, C., Hrsg.) 42—51, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York. — 126. GITLOW, ST. E., BERTANI, L. M., RAUSEN, A., GRIBETZ, D. & DZIEDZIC, ST. (1970), Cancer (Philadelphia) 25, 1377—1388. — 127. GREEFF, K. & STROBACH, H. (1970), Herz/Kreisl. 2, 431—436. — 128. SCHÜMMANN, H. J. (1961), Deut. Med. Wochenschr. 86, 2016—2019. — 129. CROUT, J. R. (1966), Pharmacol. Rev. 18, 651—657. — 130. SAPIRA, J. D., KLANIECKI, T. & RATKIN, G. (1970), J. Amer. Med. Ass. 212, 2243—2245. — 131. ENGELMAN, K. & SJOERDSMA, A. (1964), J. Amer. Med. Ass. 189, 107—112.

Priv. Doz. Dr. Dr. H. Wisser  
Klinisch-Chemische Abteilung  
Robert-Bosch-Krankenhaus  
7 Stuttgart 1